

УДК: 577.352.336

Сравнительное изучение взаимодействия флуоресцентных красителей К-35 и К7-1045 с белками сыворотки крови крыс**Т.С.Дюбко, В.І.Сидоров, О.А.Соколик, І.Г.Єрмоленко, С.У.Хабусева, Ю.Ю.Рождя*, Л.Д.Паценкер***ГНУ НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины (Харьков, Украина)***НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
tdyubko@mail.ru*

В работе методами флуоресцентной спектроскопии, гель-хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле изучено в сравнительном аспекте взаимодействие флуоресцентных красителей К-35 и К7-1045 с белками сыворотки крови крыс. Установлено, что в сыворотке красители К-35 и К7-1045 главным образом связываются с альбумином. Показано, что краситель К-35 может быть применен для оценки степени нагруженности сывороточного альбумина крысы лигандами различного происхождения.

Ключевые слова: сыворотка крови крыс, альбумин, флуоресценция, красители, К-35, К7-1045.

Порівняльне дослідження взаємодії флуоресцентних барвників К-35 та К7-1045 з білками сироватки крові щурів**Т.С.Дюбко, В.І.Сидоров, О.О.Соколик, І.Г.Єрмоленко, С.У.Хабусева, Ю.Ю.Рождя, Л.Д.Паценкер**

В роботі з використанням методів флуоресцентної спектроскопії, гель-хроматографії і електрофорезу в поліакриламідному гелі досліджено у порівняльному аспекті взаємодію флуоресцентних барвників К-35 і К7-1045 з білками сироватки крові щурів. Встановлено, що в сироватці барвники К-35 і К7-1045 переважно зв'язуються з альбуміном. Показано, що барвник К-35 може бути використаний для оцінки ступеня навантаження сироваткового альбуміну щурів лігандами різноманітного походження.

Ключові слова: щур, сироватка, альбумін, флуоресценція, барвники, К-35, К7-1045.

Comparative study of K-35 and K7-1045 fluorescent dyes interaction with rat blood serum proteins**T.S.Dyubko, V.I.Sidorov, O.A.Sokolyk, I.G.Ermolenko, S.U.Habuseva, Yu.Yu.Rozhda, L.D.Patsenker**

Using the fluorescent spectroscopy, gel chromatography and electrophoresis in polyacrylamide gel methods interaction of fluorescent dyes K-35 and K7-1045 with rat serum proteins has been studied in the work in comparative aspect. It has been established that in serum K-35 and K7-1045 dyes bound mainly with albumin. It has been shown that K-35 dye may be used for estimating degree of rat serum albumin fullness by different ligands.

Key words: rat, serum, albumin, fluorescence, dyes, K-35, K7-1045.

Введение

Альбумин является одним из важнейших компонентов сыворотки крови, преобладающим среди сывороточных белков по количественному содержанию. Благодаря способности обратимо связывать различные низкомолекулярные вещества экзогенного и эндогенного происхождения (лекарства, яды, продукты метаболизма и т.п.), альбумин осуществляет их транспортировку к различным органам и тканям организма (Сорокина, Залевская, 1990). При этом степень нагруженности альбумина низкомолекулярными лигандами находится в прямом соответствии со степенью интоксикации организма (Альбумин сыворотки ..., 1998).

На способности низкомолекулярных лигандов вытеснять флуоресцентный краситель К-35 из центров связывания на молекуле сывороточного альбумина человека (САЧ) основан разработанный Г.Е.Добрецовым и соавт. метод определения степени заполнения организма токсическими веществами, образующимися в процессе жизнедеятельности организма либо поступающими из внешней среды. Их накопление в тканях и связывание с альбумином плазмы может вызывать токсический эффект.

Для оценки степени заполнения связывающих центров альбумина лигандами (к которым могут быть отнесены токсические вещества) введен показатель, названный индексом токсичности, Т (Альбумин сыворотки ..., 1998):

$$T = \frac{ОКА}{ЭКА} - 1,$$

где ОКА – общая концентрация альбумина в сыворотке (плазме) крови, а ЭКА – эффективная концентрация альбумина, то есть та часть молекул, которая не загружена токсическими лигандами.

Параметр Т не зависит от того, какое вещество является причиной токсикоза и может использоваться для характеристики отравлений различными веществами (лекарствами, ядами и т.п.). С помощью индекса токсичности Т можно сравнивать степень отравления в различных группах исследуемых индивидуумов. Чем выше величина Т, тем выше степень заполнения (отравления) организма токсическими веществами. Часто наряду с показателем индекса токсичности также используют величину, называемую резервом связывающей способности альбумина (РСА), определяемую как

$$РСА = \frac{ЭКА}{ОКА} \times 100\%$$

и выражаемую в процентах.

Многочисленными экспериментами доказаны высокая чувствительность и адекватность применения зонда К-35 при диагностике и оценке тяжести протекания заболеваний различного генеза (Альбумин сыворотки ..., 1998). В то же время, разнообразные задачи, требующие определения связывающей способности альбумина и его нагруженности токсическими лигандами, часто возникают также при проведении экспериментов на животных, в частности крысах. С целью изучения возможности применения разработанного Г.Е.Добрецовым и соавт. метода определения степени заполнения альбумина токсическими веществами при проведении исследований на лабораторных крысах, в данной работе изучали взаимодействие с сывороткой крови крыс флуоресцентного красителя К-35, а также его близкого структурного аналога, нового красителя К7-1045 (Дюбко и др., 2006; Sokolyk et al., 2007), отличающегося от К-35 положением диметиламиногруппы в нафталиновом кольце и природой радикала в имидной части.

Объекты и методы исследования

В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов весом 160–180 г в соответствии с «Европейской конвенцией защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1985).

Сыворотку получали из крови крыс после декапитации центрифугированием в течении 15 мин при 800 g. САЧ (обезжиренная фракция V), цитохром С и овальбумин были получены из фирмы «Sigma» (США).

Общий белок в образцах определяли по поглощению при 280 нм (Демченко, 1981), а общее содержание альбумина определяли спектрофотометрически при 630 нм по реакции с бромкрезоловым зеленым, используя набор реактивов «Альбумин-Агат» (Россия).

Хроматографическое разделение белков сыворотки проводили на колонке размером 1,5 x 35 см, заполненной сефадексом G-150 и уравновешенной 5 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4. Фракции с колонки снимали объемом по 4 мл. Для анализа белкового состава снятые с колонки фракции сыворотки подвергали электрофорезу в 7,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), pH 8,9 по стандартной методике (Остерман, 1984). В качестве маркерных белков использовали цитохром С (м.м. 12 000 Да) и овальбумин (м.м. 45 000 Да). После проведения электрофореза гели окрашивали кумасси G-250. Высушенные гели сканировали и анализировали с помощью компьютера распределение плотности окраски.

Флуоресцентные красители К-35 и К7-1045 (коммерческие названия) были синтезированы в ГНУ НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины (г. Харьков). Перед использованием они были растворены в этиловом спирте. Исходные концентрации красителей К-35 и К7-1045 составляли $0,58 \times 10^{-3}$ и $0,65 \times 10^{-3}$ М соответственно. Спектры поглощения и флуоресценции К-35 и К7-1045 в 5 мМ натрий-фосфатном буфере и в этаноле показаны на рис. 1. Квантовый выход флуоресценции К-35 и К7-1045 определяли в условиях насыщения белка красителями, используя в качестве эталона уранин.

Флуоресцентные измерения выполняли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Спектры флуоресценции белков сыворотки возбуждали светом с длиной волны 280 и 296 нм. Для флуоресцентных измерений сыворотку (за исключением хроматографических фракций) разводили в 40 раз физиологическим раствором с добавлением 5 мМ натрий-фосфатного буфера, pH 7,4. Флуоресценцию красителей возбуждали в максимумах длинноволновых полос их поглощения (425 нм для К-35 и 460 нм для К7-1045). Ширина входной и выходной щелей монохроматоров составляла 3 и 5 нм соответственно. Ошибка в определении положения максимумов спектров в шкале длин волн не превышала ± 1 нм. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin

Elmer, США). Все спектральные измерения выполнялись при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в стандартных кварцевых кюветах $1 \times 1 \times 3$ см.

Обработку спектров поглощения производили в программе UV WinLab v. 2.85.04, входящей в программное обеспечение спектрофотометра. Спектры флуоресценции обрабатывали, используя программное обеспечение спектрофлуориметра. Статистическую обработку результатов производили с помощью программного пакета «Statistica» v. 5.5.

Результаты и обсуждение

Для того, чтобы оценить влияние альбумина на спектральные свойства исследуемых флуоресцентных красителей, первоначально нами было выполнено сравнение основных спектральных характеристик К-35 и К7-1045 при связывании с очищенным САЧ.

При растворении спиртовых растворов красителей в более полярном водном окружении (5 мМ натрий-фосфатном буфере) их флуоресценция в значительной степени тушится водой (рис. 1, б), а спектры поглощения имеют несимметричную форму (кривые 2 и 4 на рис. 1, а), обусловленную наложением двух полос поглощения, принадлежащих, по-видимому, свободным и находящимся в ассоциатах молекулам красителей. Это затрудняет точное определение спектральных параметров красителей, поэтому влияние белка на спектры поглощения и флуоресценции К-35 и К7-1045 оценивали относительно аналогичных параметров красителей в полярном растворителе этаноле (табл. 1).

При связывании с САЧ спектр поглощения К-35 претерпевает длинноволновый сдвиг на 25 нм, а спектр флуоресценции смещается в коротковолновую сторону на 17 нм по сравнению с аналогичными параметрами в этаноле. Положение спектров поглощения К7-1045 в растворе САЧ на 10 нм больше, чем в этаноле, а в присутствии белка спектр флуоресценции красителя сдвигается в коротковолновую сторону на 56 нм по сравнению со спиртом. Квантовый выход зонда К-35 при связывании с САЧ возрастает в 40 раз по сравнению с водой или натрий-фосфатным буфером, а красителя К7-1045 – почти в 45 раз. Приведенные показатели, а также высокие значения стоксовых сдвигов спектров ($\Delta\lambda_{ST}$) говорят о том, что оба используемых красителя обладают хорошими сольватифлуорохромными свойствами и высокочувствительны к изменению полярности окружения.

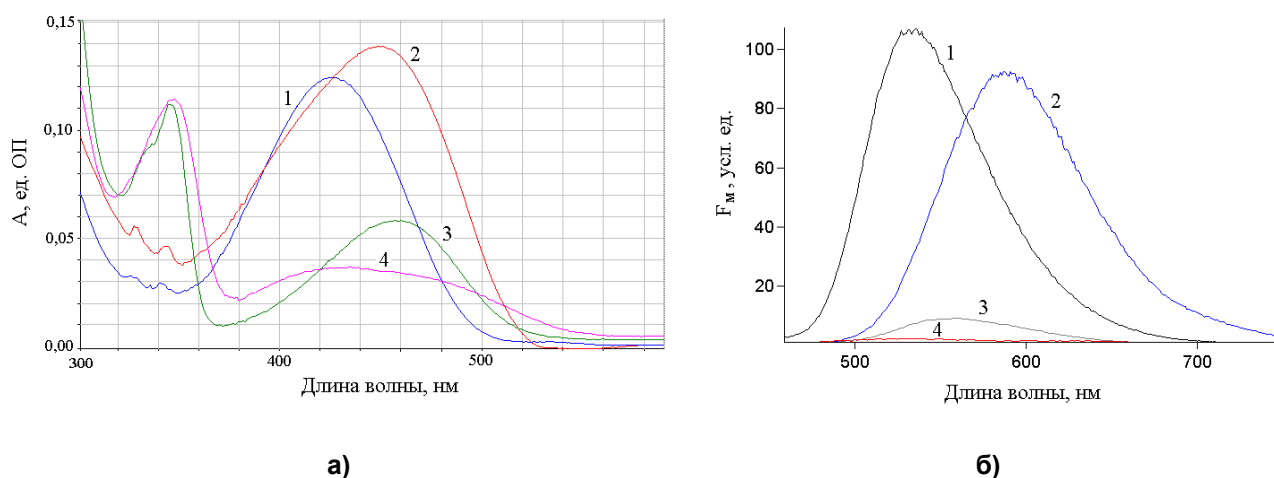


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) красителей К-35 (1, 3) и К7-1045 (2, 4) в этаноле (1, 2) и 5 мМ натрий-фосфатном буфере (3, 4)

Красители К-35 и К7-1045 содержат карбоксильную группу, которая в воде при pH 7,4 несёт отрицательный заряд. При этом, по данным (Альбумин сыворотки ..., 1998), в сыворотке (плазме) крови человека 95% связанного К-35 приходится на долю альбумина. То есть данный зонд обладает высокой избирательностью связывания с сывороточным альбумином, что позволяет исследовать этот белок в своем естественном окружении. К-35 связывается на молекуле альбумина в двух типах центров сорбции (так называемые центры типа I и центры типа II) и примерно одинаково реагирует на присутствие метаболитов, заполняющих те или другие центры (Альбумин сыворотки ..., 1998). Краситель К7-1045 также связывается с молекулой САЧ в двух различных центрах, а его усреднённая константа связывания K_s с альбумином имеет тот же порядок, что и для зонда К-35 (см. табл. 1). В присутствии К-35 и К7-1045 наблюдалось также тушение собственной флуоресценции САЧ в результате переноса энергии с триптофана белка на молекулы красителей, которое может рассматриваться в качестве дополнительного доказательства их связывания с альбумином.

Таким образом, из сравнительной оценки спектральных свойств К7-1045 и известного зонда при связывании с САЧ следует, что новый краситель К7-1045 имеет хорошие перспективы применения в качестве флуоресцентного зонда для исследования САЧ.

Таблица 1.

Некоторые спектральные свойства красителей К-35 и К7-1045 в растворах и при связывании с САЧ

Краситель	Мол. масса	Среда	$\lambda_{\text{п}}$, нм	ε , $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\lambda_{\text{ф}}$, нм	$\Delta_{\text{СТ}}$, нм	QY, %	$K_{\text{с}}$, М^{-1}	N
К-35	360	Буфер	400 _{пл} 448±2	—	555±1	—	—	—	—
		Этанол	425±3	13 225	532±1	107	0,3	—	—
		САЧ	450±2	—	515±1	65	12	4,2×10 ⁵	2,2
К7-1045	354	Буфер	420±5 ~480 _{пл}	—	—	—	—	—	—
		Этанол	458±2	4 060	586±2	128	0,2	—	—
		САЧ	468±2	—	530±2	62	9	3,4×10 ⁵	1,8

Примечания: $\lambda_{\text{п}}$ и $\lambda_{\text{ф}}$ – положение максимумов спектров поглощения и флуоресценции соответственно; ε – коэффициент молярной экстинкции; QY – квантовый выход; $\Delta_{\text{СТ}}$ – стоксов сдвиг; $K_{\text{с}}$ и N – усредненные константа и число мест связывания соответственно; пл – плечо спектра.

На следующем этапе работы были оценены параметры собственной флуоресценции сыворотки крови крыс. Сравнение спектров собственной флуоресценции сыворотки крыс показало (табл. 2), что при возбуждении общей ($\lambda_{\text{возб}}=280$ нм) и триптофановой ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) флуоресценции спектры белков сыворотки характеризуются близкими значениями интенсивности и имеют достаточно длинноволновое положение (338–340 нм). Это означает, что флуоресценция сывороточных белков обусловлена преимущественно триптофановыми остатками, частично доступными водному окружению (Демченко, 1981; Бурштейн, 1977). Поскольку, по полученным нами данным и по данным работ (Западнюк и др., 1983), при содержании общего белка в сыворотке крови крысы 69,1±0,8 мг/мл, количество альбумина в сыворотке составляет 29,0±0,4 мг/мл (около 42%), можно полагать, что существенный вклад во флуоресценцию сыворотки вносит альбумин, флуоресценция которого в основном обусловлена триптофаном (Сорокина, Залевская, 1990; Альбумин сыворотки ..., 1998).

Таблица 2.

Параметры спектров собственной флуоресценции сыворотки крови крыс (n=15)

Параметры	$\lambda_{\text{возб}}=280$ нм	$\lambda_{\text{возб}}=296$ нм
$F_{\text{макс}}$, усл. ед.	453±14	390±9
$\lambda_{\text{макс}}$, нм	339±1	340±1

При связывании зонда К-35 с сывороткой крови крысы интенсивность флуоресцентного сигнала зонда возрастает многократно, а максимум спектра ($\lambda_{\text{макс}}$) находится, как и при связывании с САЧ, около 515±1 нм (рис. 2). При связывании зонда К7-1045 с сывороткой крыс $\lambda_{\text{макс}}$ находится при 534±2 нм, что на 6 нм больше по сравнению с САЧ (см. табл. 1).

Для выяснения вопроса о том, с какими белками сыворотки крысы преимущественно связываются флуоресцентные зонды, сыворотка крови была разделена на фракции на колонке с сефадексом G-150. Собранные фракции анализировали с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), а также регистрировали собственную флуоресценцию белков и интенсивность флуоресценции зондов в каждой фракции.

Как видно из рис. 3, при возбуждении в УФ-области наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается во фракциях 6–9. Причём одинаковый характер изменения кривых флуоресценции при возбуждении светом с длинами волн 280 и 296 нм (рис. 3, а) свидетельствует о том, что флуоресценция белков в указанных фракциях обусловлена в основном триптофаном. Однако окружение триптофановых остатков во фракциях различно. Во фракциях 6–9 наблюдается постепенное смещение положения максимума спектров триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм)

в длинноволновую сторону. Наиболее длинноволновым является положение спектров триптофановых остатков во фракциях 9–11 (рис. 3, б).

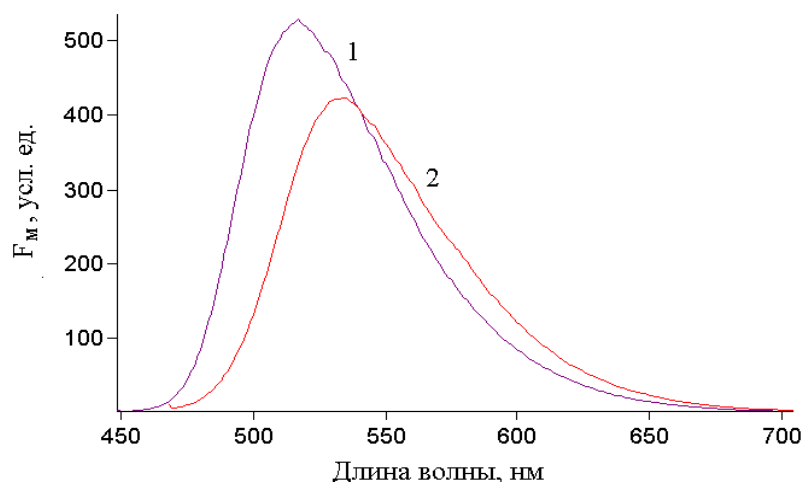


Рис. 2. Вид спектров флуоресценции красителей К-35 (1) и К7-1045 (2) в сыворотке крови крысы. Содержание красителей К-35 и К7-1045 в образцах составляло 6,0 и 6,3 мкМ соответственно

На рис. 4 представлены гель-электрофорез и денситограммы фракций сыворотки крови крыс. Как видно из рис. 4, а, максимальное количество сывороточного альбумина находится во фракции 9. В меньшем количестве этот белок представлен также во фракции 10. Во фракциях 6 и 7 преобладают белки высокой молекулярной массы, которые могут быть отнесены к α -иммуноглобулинам (Западнюк и др., 1983). По фотографии геля можно видеть, что во фракциях 9 и 10 наряду с альбумином присутствуют также другие белки, имеющие как меньшую, так и большую молекулярные массы по сравнению с альбумином (рис. 4, б).

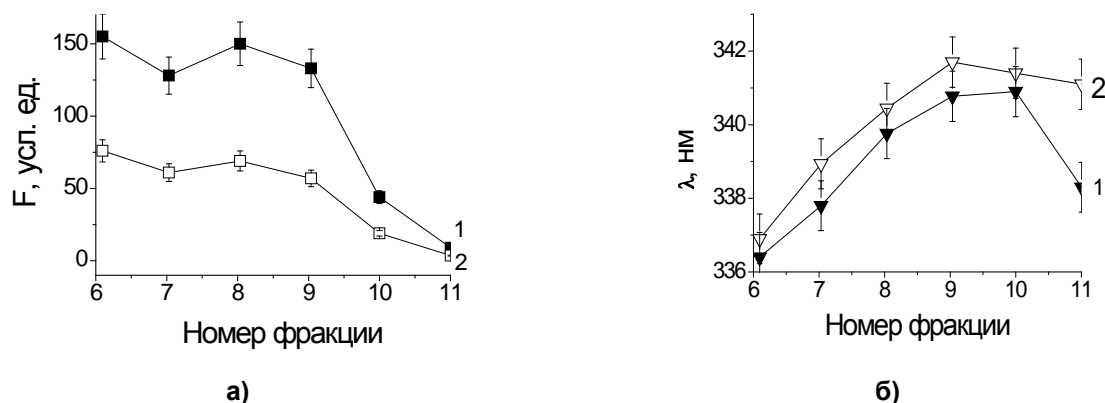


Рис. 3. Интенсивности (а) и положение максимумов (б) спектров флуоресценции хроматографических фракций сыворотки крови крысы: 1 – $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм; 2 – $\lambda_{\text{возб}}=296$ нм

Согласно (Западнюк и др., 1983), электрофоретические фракции белков сыворотки имеют следующий состав: альбумин – 42%, α_1 -глобулин – 29%, α_2 -глобулин – 5%, β -глобулин – 18% и γ -глобулин – 6%.

Анализ связывания К-35 и К7-1045 с отдельными фракциями сыворотки показал, что оба красителя в наибольшей степени связываются с фракциями 8–10, содержащими больше всего альбумина (рис. 5, 6). При этом максимум спектра флуоресценции К-35 расположен при 515 ± 1 нм, а К7-1045 – при 548 ± 2 нм. Во фракциях 6 и 7, в которых преобладают иммуноглобулины, максимум спектров флуоресценции К-35 находится в более коротковолновой области (512 ± 2 нм). В то же время, во фракциях 12–14, содержащих в сравнении с альбумином более низкомолекулярные белки, спектры флуоресценции К-35 имеют наиболее длинноволновое положение (548 ± 2 нм). Однако интегральная интенсивность флуоресценции зонда в этих фракциях не превышает 2% от его флуоресценции в «альбуминовых» фракциях. Максимум спектров флуоресценции красителя К7-1045

во фракциях 6–7 расположен в более коротковолновой области (530–536 нм), чем в «альбуминовых» фракциях, однако во фракциях 11–14 наблюдаются 2 максимума – около 527 ± 3 и 625 ± 5 нм, свидетельствующие о присутствии в этих фракциях компонент с существенно отличающимися характеристиками центров, связывающих К7-1045. Наблюдаемые различия в направлении сдвигов положения максимумов спектров флуоресценции К-35 и К7-1045 при связывании с альбумином сыворотки могут указывать на некоторые отличия в физико-химических свойствах центров связывания этих красителей с белком, в частности, на неодинаковые свойства различных типов центров сорбции красителя К7-1045 на молекуле альбумина. Тем не менее, резкие изменения спектральных характеристик зондов во фракциях сыворотки, содержащих альбумин, указывают в целом на их высокую чувствительность к присутствию данного белка.

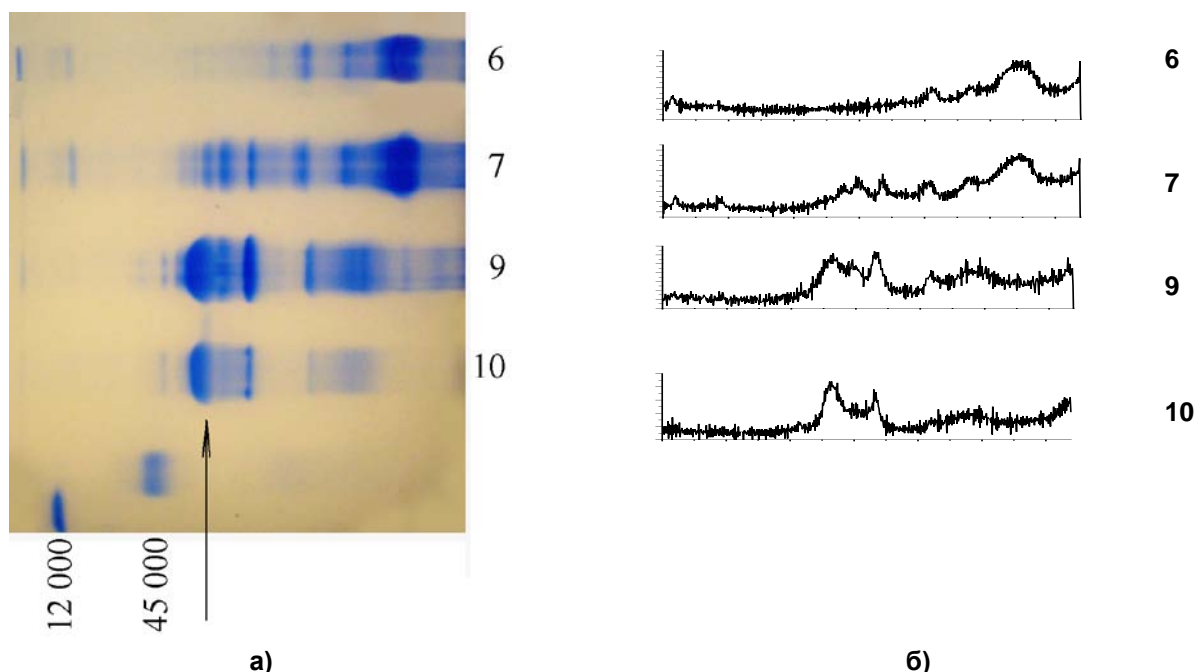


Рис. 4. Гель-электрофорез (а) и денситограммы (б) фракций 6, 7, 9 и 10 сыворотки крови крыс. Фракция альбумина указана стрелкой

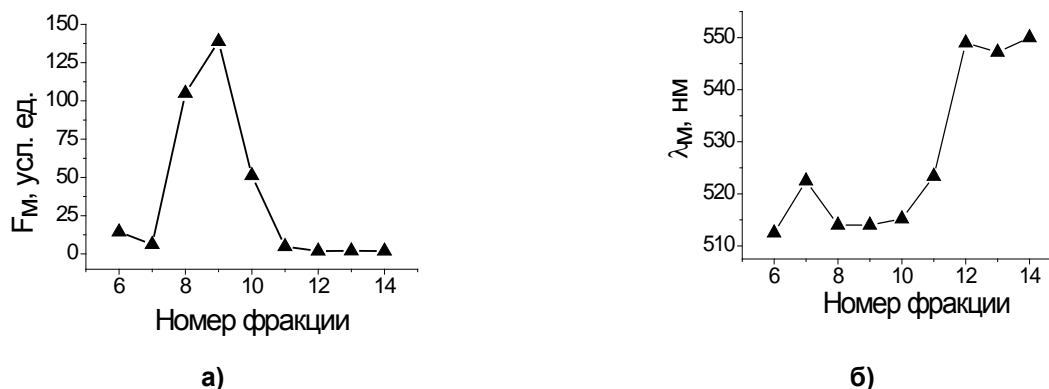


Рис. 5. Интенсивности (а) и положение максимумов (б) спектров флуоресценции красителя К-35 в хроматографических фракциях сыворотки крови крысы

Сравнительная оценка интенсивности флуоресценции красителей К-35 и К7-1045 во фракциях 7 и 9, в которых преобладает соответственно процентное содержание иммуноглобулинов и альбумина, показало (рис. 7), что интегральная интенсивность флуоресценции красителя К-35 во фракции, содержащей максимальное количество иммуноглобулинов, составляет $5 \pm 0,5$ % от таковой для фракции 9, обогащенной сывороточным альбумином. Этот результат хорошо согласуется с данными работ (Альбумин сыворотки ..., 1998), в которых показано, что в сыворотке крови человека 95% зонда К-35 связывается с альбумином и только 5% – с иммуноглобулинами. Относительный

квантовый выход красителя К7-1045, связанного с фракцией 7 сыворотки, составляет $5,9 \pm 0,3$ %. То есть, оба исследуемых красителя имеют высокую избирательность связывания с сывороточным альбумином крысы, а их доля, связанная с иммуноглобулинами сыворотки, не превышает 6%.

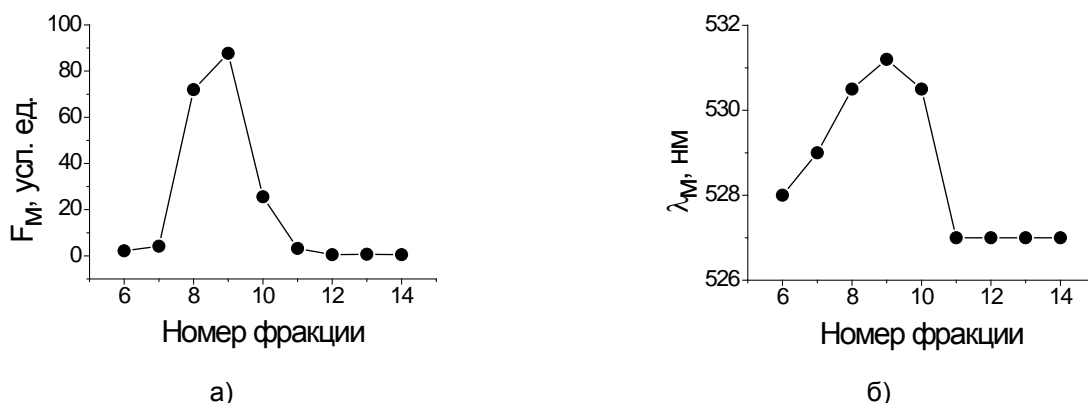


Рис. 6. Интенсивности (а) и положение максимумов (б) спектров флуоресценции красителя К7-1045 в хроматографических фракциях сыворотки крови крысы

Полученные результаты показывают, что метод определения показателей Т и РСА, разработанный Г.Е.Добрецовым и сотр. для анализа сыворотки человека, может быть применен при исследованиях, проводимых на сыворотке крови крыс. Определенные с помощью зонда К-35 показатели нагруженности токсическими лигандами альбумина сыворотки крови здоровых крыс составляют: $T=0,72 \pm 0,18$ и $РСА=60,4 \pm 1,4$ %. Это показывает, что у здоровых взрослых крыс около 40% циркулирующего в крови альбумина нагружено лигандами эндогенного и экзогенного происхождения.

Таким образом, из полученных результатов следует, что в сыворотке крови крыс, как и в сыворотке крови человека, красители К-35 и К7-1045 связываются главным образом с альбумином. При этом, как и в случае сывороточного альбумина человека, краситель К-35 может быть использован для определения степени нагруженности сывороточного альбумина токсическими лигандами при проведении различных экспериментальных исследований с использованием крыс в качестве лабораторных животных.

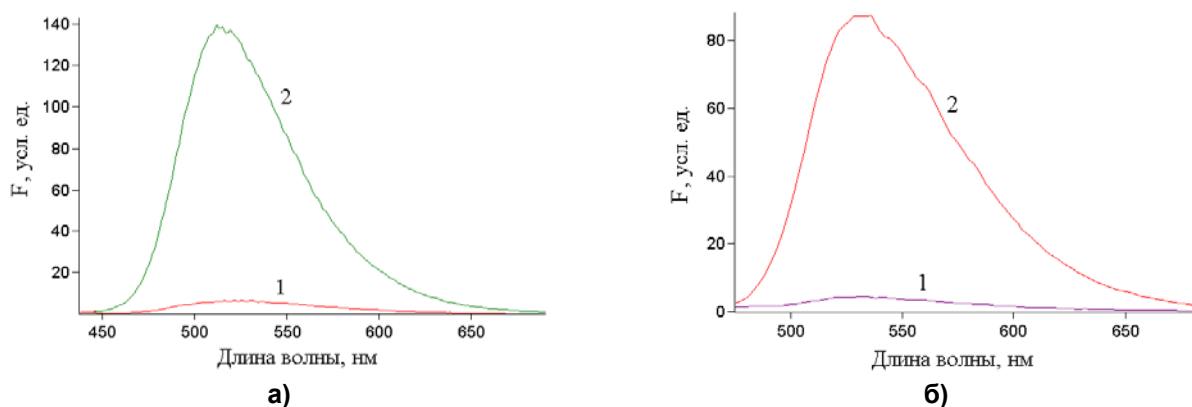


Рис. 7. Спектры флуоресценции красителей К-35 (а) и К7-1045 (б) в электрофоретических фракциях 7 (1) и 9 (2) сыворотки крови крысы. Содержание красителей К-35 и К7-1045 в образцах составляло 2,9 и 3,0 мкМ соответственно

Исследования, выполненные с применением нового красителя К7-1045, показали, что, несмотря на несколько отличающийся механизм связывания с альбумином, этот краситель имеет хорошие перспективы для использования в качестве «альбуминового» флуоресцентного зонда. При этом, использование обоих красителей, К-35 и К7-1045, позволит получить более полную и разностороннюю информацию о структурно-функциональном состоянии альбуминов человека и животных при действии различных факторов.

Список литературы

- Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А.Грызунова и Г.Е.Добрецова. – Кн.2. – М.: ГЭОТАР, 1998. – 440с.
- Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // Биофизика. – М.: ВИНТИ АН СССР, 1977. – Т.7. – 189с.
- Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. – К.: Наук. думка, 1981. – 208с.
- Дюбко Т.С., Соколик О.А., Ермоленко И.Г., Паценкер Л.Д. Перспективы использования флуоресцентного красителя Е-515 как специфичного маркера альбумина // Тез. докл. IV з'їзду Укр. біофіз. тов-ва. – Донецьк, 2006. – С. 114–115.
- Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Изд. 3-е. – К.: Вища школа, 1983. – 383с.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1984. – 288с.
- Сорокина Д.А., Залевская И.Н. Структурно-функциональные свойства белков. – К.: Вища школа, 1990. – 216с.
- Sokolyk O., Dyubko T., Yermolenko I. et al. Application of K-35 and K7-1045 fluorescent dyes for investigation of low molecular weight molecules interaction with serum albumin // International confer. "Modern Physical Chemistry for Advanced Materials". – Kharkov, 2007. – P. 194–196.

Представлено: І.А.Боровим

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським

© Т.С.Дюбко, В.І.Сидоров, О.О.Соколик, І.Г.Єрмоленко, С.У.Хабусєва, Ю.Ю.Рожа, Л.Д.Паценкер, 2009